

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
15 novembre 2001 (15.11.2001)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 01/86291 A1

(51) Classification internationale des brevets⁷ :
G01N 33/50, C12Q 1/68, C12N 7/02

Manuel [IT/FR]; 49, rue Félix Faure, F-91270 Vi-
gneux-sur-Seine (FR).

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR01/01366

(74) Mandataire : CABINET ORES; 6, avenue de Messinc,
F-75008 Paris (FR).

(22) Date de dépôt international : 4 mai 2001 (04.05.2001)

(81) États désignés (*national*) : JP, US.

(25) Langue de dépôt : français

(84) États désignés (*régional*) : brevet européen (AT, BE, CH,
CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT,
SE, TR).

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
00/05852 9 mai 2000 (09.05.2000) FR

Publiée :
— avec rapport de recherche internationale
— avant l'expiration du délai prévu pour la modification des
revendications, sera republiée si des modifications sont
reçues

(71) Déposant (*pour tous les États désignés sauf US*) : NAU-
TILUS BIOTECH [FR/FR]; 4, rue Pierre Fontaine,
F-91000 Evry (FR).

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrégia-
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de
la Gazette du PCT.

(72) Inventeur; et

(75) Inventeur/Déposant (*pour US seulement*) : VEGA,

WO 01/86291 A1

(54) Title: METHOD FOR DETERMINING BIOLOGICAL AGENTS IN LIVING TARGET CELLS

(54) Titre : PROCEDE DE DETERMINATION D'AGENTS BIOLOGIQUES DANS DES CELLULES CIBLES VIVANTES

(57) Abstract: The invention concerns a method for determining titre (concentration) of biological agents, such as gene transfer viral vectors, in real time, in living target cells and its uses in the field of gene therapy and diagnosis.

(57) Abrégé : Procédé de détermination du titre (concentration) d'agents biologiques, tels que des vecteurs viraux de transfert de gènes, en temps réel, dans des cellules cibles vivantes et ses applications dans le domaine de la thérapie génique et du diagnostic.

PROCEDE DE DETERMINATION D'AGENTS BIOLOGIQUES DANS DES CELLULES CIBLES VIVANTES

L'invention est relative à un procédé de détermination du titre
5 (concentration) d'agents biologiques, tels que des vecteurs viraux de transfert de gènes, en temps réel, dans des cellules cibles vivantes, ainsi qu'à ses applications (thérapie génique, génomique fonctionnelle, diagnostic viral, vaccins, protéines recombinantes).

Les progrès relatifs aux transferts de gènes en thérapie génique
10 dépendent d'une part de la capacité à développer et à produire des vecteurs permettant, dans la cellule cible, une expression régulée d'une protéine ou d'un ARN qui possèdent des effets thérapeutiques et d'autre part de la capacité à identifier de nouveaux gènes thérapeutiques.

Ainsi, avec le développement récent du domaine de la génomique
15 fonctionnelle, les vecteurs initialement développés pour le transfert de gènes, sont aussi utilisés comme outils pour le criblage des banques de gènes.

Ces progrès impliquent :

- la construction et le criblage de banques de vecteurs de transfert de gènes,
20
- le développement de constructions de vecteurs optimisées et parfaitement adaptées à chaque application thérapeutique, notamment en terme de ciblage tissulaire et de régulation de l'expression et
- la production en grande quantité de vecteurs contrôlés, standardisés et de qualité optimale, permettant de réaliser des études précliniques et des essais
25 cliniques de phase I.

Dans ce contexte, afin d'analyser rapidement de nombreuses constructions de vecteurs et d'optimiser leur production en grande quantité, il est important de pouvoir déterminer facilement, rapidement et précisément la concentration desdits vecteurs par des méthodes performantes.

30 Les méthodes de détermination de la concentration ou du titre desdits vecteurs, en particulier des vecteurs viraux, décrites dans la littérature se divisent en méthodes physiques et en méthodes biologiques.

Les méthodes physiques mesurent le titre en particules physiques (*pp*) (Mittereder et al., J. Virol., 1996, 70, 11, 7498-7509 ; Atkinson et al., NAR, 1998, 26, 11, 2821-2823 ; Nelson et al., Hum. Gene Ther., 1998, 9, 16, 2401-2405), qui représente le nombre total de particules virales de vecteur ; habituellement ce titre est évalué soit directement par comptage des particules virales en microscopie électronique, soit indirectement par mesure du contenu en acides nucléiques (hybridation ou absorbance des acides nucléiques (DO_{260}) pour AAV et AdV, respectivement), ou en protéines virales (activité RT et contenu en p24, par exemple pour MLV et HIV, respectivement) des vecteurs. La mesure du titre en particules physiques ne reflète pas la quantité de particules infectieuses présentes et biologiquement actives, en raison de la présence de particules défectives (*defective-interfering particles* ou *DI*) non infectieuses, sans génome ou avec un génome incomplet.

Les méthodes biologiques permettent, en revanche, de déterminer un titre en particules infectieuses (*ip* : unités infectieuses, unités formant plaque, unités de transduction) (Mittereder et al., précité ; Salvetti et al., Hum. Gene Ther., 1998, 9, 5, 695-706 ; Atkinson et al., NAR, 1998, 26, 11, 2821-2823) par la mesure d'un paramètre biologique qui reflète l'activité du vecteur dans des cellules infectées en culture : réplication virale (AAV), intégration du provirus (rétrovirus, HIV), lyse cellulaire (formation de foyers ou de plages de lyse, uniquement dans le cas de virus lytiques (AdV, HSV)) et expression du transgène (tous les types de vecteurs). *ip* mesure le nombre de particules actives dans le processus biologique dont l'effet est mesuré. Ainsi, les préparations de vecteur présentant un titre élevé en particules infectieuses et un rapport particules physiques/particules infectieuses faible sont considérées comme étant de haute qualité, ces deux paramètres étant considérés comme fournissant une information quantitative concernant la performance d'une préparation d'un vecteur de transfert de gène.

Quelle que soit la nature du paramètre mesuré, les méthodes décrites reposent essentiellement sur une dilution en série du vecteur (environ 10 à 20 dilutions en double ou en triple), suivie d'une période d'incubation du vecteur avec les cellules (1 à 15 jours), puis du traitement des cellules (lyse, fixation, coloration, addition de substrat, hybridation, PCR), de la mesure du paramètre fonctionnel et enfin de la détermination du titre qui correspond à la dilution limite, c'est-à-dire à la dilution la

plus élevée pour laquelle la valeur du paramètre biologique mesuré atteint sa limite de détection.

Le titre est généralement déterminé à partir de la courbe qui représente les valeurs du paramètre biologique en fonction de la dilution du vecteur :

5 - par une extrapolation linéaire à partir de la région centrale quasi-linéaire de la courbe suivie de la détermination de l'intersection avec l'axe des abscisses ou

 - par une approximation asymptotique de ladite courbe dans la région des dilutions élevées ; une telle approximation peut être effectuée à l'aide d'un
10 programme informatique, qui repose sur une fonction hyperbolique pour le calcul du titre.

Ainsi, plus le nombre de dilutions testées est élevé, plus la valeur du titre sera précise.

Cependant ces techniques sont peu fiables et présentent
15 l'inconvénient de ne pas être standardisées. Pour résoudre ce problème, de nouvelles méthodes mieux adaptées à la détermination du titre (ou concentration) et à la comparaison de différents virus recombinants utilisés en thérapie génique ont été proposées (E.M. Atkinson et al, précité ; Demande Internationale PCT WO 99/11764). Par exemple, dans l'article au nom d'E.M. Atkinson et al., précité et dans la Demande
20 Internationale PCT WO 99/11764, la méthode qui est décrite met en œuvre essentiellement une étape d'amplification du matériel génétique viral dans une lignée cellulaire hôte, des préparations de vecteur standard de titre connu obtenues par dilutions en série et un contrôle interne de titre connu. De manière plus précise, la méthode comprend dans différents puits d'une plaque de microtitration, l'infection de
25 cellules à l'aide de dilutions en série d'une préparation virale (10 dilutions en triplicat), la réplication du génome viral dans ladite cellule hôte pendant 48 h à 72 h, la lyse chimique de ladite cellule, une hybridation de l'acide nucléique, la mesure de la quantité relative d'acide nucléique viral répliqué dans chaque puits et la détermination du titre par extrapolation linéaire de la courbe, qui représente les valeurs des mesures
30 obtenues en fonction de la dilution du vecteur.

Ainsi, les méthodes de l'Art antérieur, même les mieux adaptées comme celles décrites par d'E.M. Atkinson et al., précité, ne répondent pas aux

besoins du développement et de la production des vecteurs de transfert de gènes pour les raisons suivantes :

- elles sont très lourdes à mettre en œuvre et comprennent de nombreuses manipulations, à chaque étape de la méthode, en raison du nombre important d'échantillons correspondant à chaque dilution de vecteur. Par conséquent, elles ne sont pas utilisables dans le contexte du développement et de la production des vecteurs de transfert de gènes, qui implique le traitement de très nombreux échantillons pour comparer différentes constructions ou conditions de production des vecteurs ou bien pour suivre la cinétique de production de ces vecteurs,
- elles ne sont pas standardisées pour la plupart,
- elles sont difficilement automatisables, étant donné le nombre et la complexité des étapes à mettre en œuvre, et
- le résultat est obtenu à un temps fixe qui, en fonction de la nature du paramètre mesuré, est de plusieurs jours (expression d'un transgène) à plusieurs semaines (formation de plages de lyse). Ainsi, les délais nécessaires pour la mise en œuvre de ces méthodes ne sont pas adaptés à la détermination rapide de la concentration des vecteurs de transfert de gènes vecteurs, dans le criblage des banques de vecteurs, le contrôle en cours de production ou bien pour suivre la cinétique de production de ces vecteurs.

La présente invention s'est en conséquence donnée pour but, de fournir un procédé de détermination du titre d'un agent biologique qui répond mieux au besoin de la pratique, en ce qu'elle permet l'analyse de nombreux échantillons en temps réel.

L'invention a également pour objet les applications dudit procédé pour le criblage, l'analyse et la production des vecteurs viraux de transfert de gènes, des vaccins viraux et des protéines recombinantes ainsi que pour le diagnostic des infections virales.

La présente invention a pour objet un procédé de détermination du titre d'un agent biologique interagissant avec des cellules cibles vivantes, lequel procédé est caractérisé en ce qu'il comprend au moins les étapes suivantes :

(a₁) l'incubation dudit agent biologique à une concentration C initiale inconnue, avec lesdites cellules cibles à une concentration D constante,

(b₁) la mesure à différents temps successifs t , de l'intensité i d'un même signal, qui résulte de la réaction agent biologique + cellules cibles vivantes,

(c₁) la détermination du temps t_β correspondant à la valeur $i = \beta$, choisie dans l'intervalle $\beta_{\min} < \beta < \beta_{\max}$, tel que β_{\min} et β_{\max} correspondent aux valeurs
 5 de i au point d'inflexion de la courbe $i = f(t)$ pour respectivement, les concentrations minimales et maximales d'un agent biologique de référence, dont la courbe $t_\beta = f(C)$ (courbe de référence), est préétablie et

(d₁) la détermination de la concentration C initiale de l'agent biologique, à l'aide de ladite courbe de référence $t_\beta = f(C)$.

10 Définitions

- on entend par agent biologique : un vecteur de transfert de gènes viral ou non-viral, un virus, un anticorps, un vaccin ou une protéine recombinante.
- on entend par cellules cibles vivantes, des cellules cibles, *in vitro* ou *ex vivo*, avant leur modification par un agent biologique.
 15
- on entend par titre C d'un agent biologique, sa concentration en particules (virus, vecteur de transfert de gène viral, vaccin viral) ou en molécules actives (protéine recombinante, anticorps), dans la réaction agent biologique + cellules cibles vivantes (C correspond au titre en particules infectieuses ou ip , tel que défini ci-
 20 dessus pour les vecteurs viraux de transfert de gènes).
- on entend par réaction agent biologique + cellules cibles vivantes, la réponse des cellules cibles à l'agent biologique ou processus biologique, il s'agit notamment :
 - de l'expression d'un gène rapporteur ou d'un transgène,
 - 25 - de la réplication, de l'intégration ou de l'activité cytolytique d'un virus,
 - d'une activité enzymatique, anti-virale, oncogénique, suppresseur de tumeur ou cytotoxique,
 - de la prolifération ou de la différenciation cellulaire, ou
 - 30 - de la liaison à des anticorps ou à des récepteurs.
- Le produit P de la réaction agent biologique + cellules cibles vivantes est mesurable par un signal ; il est déterminé par la mesure d'un paramètre

qui reflète la réponse des cellules cibles vivantes à l'agent biologique. De manière non limitative, on peut citer comme mesure : la quantité de protéine ou d'enzyme exprimée par un gène rapporteur ou un transgène, le nombre de copies de génome du vecteur viral, le nombre de cellules.

- 5 • on entend par signal, par exemple la fluorescence, la luminescence, l'absorbance ou le dénombrement de cellules. De manière non limitative, on peut citer comme technique de mesure du signal : la microscopie optique ou de fluorescence, la fluorimétrie, la luminométrie et la spectrométrie.
- on entend par mesure de l'intensité du signal, la mesure du
10 produit P de la réaction agent biologique + cellules cibles vivantes, sans intervention sur les cellules cibles et sur ladite réaction, dont le produit P est mesuré.
- on entend par agent biologique de référence, un agent biologique identique ou similaire à l'agent biologique à analyser, qui présente des modifications qui n'affectent pas son activité dans la réaction dont le produit P est mesuré.
- 15 • on entend par mesure en temps réel, une mesure dont la valeur est obtenue instantanément.

De manière surprenante, l'Inventeur a montré que l'intensité du signal i , qui reflète la réponse des cellules cibles à l'agent biologique, dépend uniquement de deux paramètres : la concentration C et le temps t . Ainsi, lorsque t augmente,
20 l'intensité du signal i augmente, proportionnellement à la valeur de C ; en conséquence, pour une valeur de C constante, i varie proportionnellement à t et pour une valeur de t constante, i varie proportionnellement à C .

Alors que pour mesurer la concentration C d'un agent biologique, les méthodes de l'Art antérieur utilisent une valeur de t constante, l'Inventeur a
25 trouvé, de manière inattendue que l'utilisation d'une valeur constante de C permet une détermination plus simple, plus rapide et plus précise de la concentration des agents biologiques.

Ainsi, l'Inventeur a montré, de manière surprenante, que la concentration d'un échantillon biologique peut-être déterminée directement, sans avoir
30 besoin de diluer ledit échantillon, (1) en mesurant les valeurs de i à différents instants t et en déterminant la valeur t_β correspondant à la valeur $i = \beta$ puis (2) en déterminant la

valeur de C correspondant à la valeur t_β , à partir de la courbe de référence $t = f(C)$, telle que définie ci-dessus.

Selon un mode de réalisation avantageux du procédé de l'invention, la courbe de référence est établie simultanément ou préalablement à l'étape (a₁), telle
5 que décrite ci-dessus, selon les étapes suivantes :

(a₀) la préparation, de n dilutions en série d'un agent biologique de référence de concentration C_0 initiale connue, correspondant respectivement aux concentrations finales C_1, C_2, \dots, C_n dudit agent biologique,

(b₀) l'incubation de chaque dilution dudit agent biologique de référence obtenue en (a₀) avec lesdites cellules cibles à une concentration D constante,
10

(c₀) la détermination à différents temps successifs t_1 à t_n de l'intensité du signal i qui résulte de la réaction agent biologique + cellules cibles vivantes, pour chaque concentration C_1, C_2, \dots, C_n dudit agent biologique de référence,

(d₀) le tracé de la courbe $i = f(t)$ pour chaque valeur C_1, C_2, \dots, C_n ,
15

(e₀) la détermination de la valeur β de i , telle que $\beta_{\min} < \beta < \beta_{\max}$ et β_{\min} et β_{\max} correspondent aux valeurs de i au point d'inflexion de la courbe $i = f(t)$ pour respectivement C_n et C_1 ,

(f₀) le tracé de la courbe de référence $t_\beta = f(C)$ pour la valeur $i = \beta$.

20 Le procédé de l'invention est parfaitement adapté à l'analyse de nombreux échantillons en temps réel, car il présente les avantages suivants :

- il est simple,
- il est rapide,
- il est précis,
- 25 - il est standardisé et
- il est automatisable.

En effet, le procédé de l'invention ne nécessite pas la dilution des échantillons ; par conséquent, il est particulièrement adapté à l'analyse de nombreux échantillons comme une banque de vecteurs de transfert de gènes. Par exemple, alors
30 que pour déterminer le titre de 30 échantillons de vecteurs, les techniques de l'art antérieur nécessitent, la réalisation de 10 à 20 dilutions et donc la manipulation de 300 à 600 échantillons de cellules à chaque étape de la technique (infection, lyse, fixation,

coloration, addition de substrat, hybridation), ce qui implique 1800 à 2400 manipulations pour une technique comprenant 3 étapes (infection, lyse ou fixation et coloration ou addition de substrat), le procédé de l'invention ne nécessite pas de dilution de l'échantillon, ni de manipulation des cellules et implique simplement 30 mesures du signal i . Par conséquent, contrairement, aux techniques de l'art antérieur, le procédé de l'invention est simple, parfaitement standardisé et automatisable.

Le procédé de l'invention est plus précis que les techniques de l'art antérieur, car dans ledit procédé les mesures sont effectuées à partir d'un même échantillon, pris à différents instants t , alors que dans les techniques de l'art antérieur les différentes dilutions de l'échantillon sont testées de façon indépendante, ce qui introduit des variations internes entre ces différentes dilutions.

Le procédé de l'invention qui utilise le temps comme paramètre variable, contrairement aux techniques de l'art antérieur, qui utilisent la concentration C comme paramètre variable, permet de déterminer la concentration des agents biologiques en temps réel en mesurant le signal i par des techniques comme la fluorimétrie, la luminométrie ou la spectrométrie, ce qui présente de nombreux avantages.

En effet, dans le procédé de l'invention, les valeurs expérimentales sont disponibles immédiatement ce qui permet d'avoir une estimation rapide de la concentration des vecteurs pour suivre la cinétique de production de ces vecteurs ou bien pour analyser rapidement une banque de vecteurs de transfert de gènes. En revanche, les techniques de l'art antérieur ne permettent pas de telles estimations étant donné qu'aucun résultat intermédiaire, en cours de test n'est disponible ; seul le résultat final est disponible, une fois que l'ensemble des données correspondant aux différentes dilutions ont été obtenues à l'instant t puis analysées, ce qui correspond à un délai de plusieurs jours à plusieurs semaines, en fonction de la technique utilisée.

Selon encore un autre mode de mise en œuvre avantageux dudit procédé, ledit signal est sélectionné dans le groupe constitué par la fluorescence, la luminescence, l'absorbance ou le dénombrement de cellules.

De manière non-limitative, le signal est avantageusement mesuré par une technique telle que : la microscopie optique ou de fluorescence, la fluorimétrie, la luminométrie et la spectrométrie.

Selon encore un autre mode de mise en œuvre avantageux dudit procédé, ledit agent biologique est sélectionné dans le groupe constitué par les virus, les vecteurs de transfert de gènes viraux et non-viraux, les vaccins, les anticorps et les protéines recombinantes.

5 La présente invention a également pour objet un kit ou une trousse de dosage (titrage) ou de détection d'un agent biologique, caractérisée en ce qu'elle comprend :

- des cellules cibles vivantes à une concentration D constante,
- un agent biologique de référence de concentration C connue,
- 10 - la courbe de référence dudit agent biologique $t_{\beta} = f(C)$.

Une telle trousse de dosage doit être associée, pour mesurer l'intensité du signal de la réaction agent biologique + cellules cibles vivantes, à un moyen physique approprié.

Cette trousse de dosage qui permet des mesures en temps réel, est
15 particulièrement adaptée, notamment à la détermination du titre (titrage) d'un vecteur utilisé en thérapie génique, d'un virus utilisé pour la production d'un vaccin, d'une protéine recombinante utilisée pour la production d'un produit biologique (médicament, réactif) ou bien au dosage et/ou à la détection d'un virus, pour le diagnostic d'une infection virale.

20 Outre les dispositions qui précèdent, l'invention comprend encore d'autres dispositions, qui ressortiront de la description qui va suivre, qui se réfère à des exemples de mise en œuvre du procédé objet de la présente invention ainsi qu'aux dessins annexés, dans lesquels :

- la figure 1 représente les valeurs expérimentales de l'intensité
25 du signal de fluorescence i , en fonction du temps t pour chaque concentration (conc.) d'un vecteur rétroviral codant la protéine fluorescente (EGFP). Les concentrations sont exprimées pour 10^6 particules infectieuses /ml.
- la figure 2 représente les courbes $i = f(t)$, déterminées à partir des valeurs expérimentales présentées à la figure 1.
- 30 - la figure 3 représente les valeurs t_{β} pour les différentes concentrations de vecteur, déterminées à partir de la courbe de la figure 2, pour la valeur $\beta = 100$ de i .

- la figure 4 représente la courbe de référence du vecteur rétro-viral $t_{\beta} = f(C)$, déterminée à partir des valeurs expérimentales présentées à la figure 3.
- la figure 5 représente les valeurs expérimentales de l'intensité du signal d'hybridation i , en fonction du temps t , pour chaque dilution d'un vecteur
5 associé à l'adénovirus recombinant (AAVr).
- la figure 6 représente les courbes $i = f(t)$, déterminées à partir des valeurs expérimentales présentées à la figure 5.
- la figure 7 représente les valeurs t_{β} pour les différentes concen-
trations de vecteur, déterminées à partir de la courbe de la figure 6, pour la valeur $\beta =$
10 -2 de i .
- la figure 8 représente la courbe de référence du vecteur AAVr, $t_{\beta} = f(C)$, déterminée à partir des valeurs expérimentales présentées à la figure 7.

Il doit être bien entendu, toutefois, que ces exemples sont donnés
uniquement à titre d'illustration de l'objet de l'invention, dont ils ne constituent en
15 aucune manière une limitation.

EXEMPLE 1 : Détermination du titre d'un vecteur rétroviral dans des cellules Rat-2.

1.1-Matériels et méthodes

L'agent biologique analysé est un vecteur rétroviral dénommé pSI-
20 EGFP (Ropp et al., Cytometry, 1995, 21, 309-317), codant le gène rapporteur de la
protéine fluorescente eucaryote (*Eukaryotic Green Fluorescent Protein* ou EGFP), les
cellules cibles sont les cellules Rat-2 (ATCC CRL1764) et la réaction agent
biologique + cellules cibles vivantes est l'expression du gène rapporteur EGFP. Le
produit P qui est mesuré pour déterminer le titre dudit vecteur (concentration en parti-
25 cules rétrovirales infectieuses ou ip) est la quantité de protéine EGFP, qui est mesurée
par fluorimétrie.

Des cellules Rat-2 sontensemencées dans les puits d'une plaque de
microtitration à une concentration constante, puis infectées à $t = 0$, avec les dilutions
1/2, 1/4 et 1/10 d'une préparation de vecteur rétroviral de référence de concentration
30 initiale connue ($C_0 = 10^6$ particules infectieuses /ml), correspondant respectivement
aux concentrations de $0,5 \cdot 10^6$; $0,25 \cdot 10^6$ et $0,1 \cdot 10^6$ particules infectieuses/ml. Aux
différents instants $t = 16$ h, 24 h, 40 h, 48 h et 64 h, l'intensité du signal de fluores-

cence i , émis par les cellules infectées par chaque dilution de vecteur est mesurée par fluorimétrie. La courbe $i = f(t)$ est ensuite tracée pour chaque dilution et la valeur β est fixée à 100. Les valeurs t_β , correspondant aux valeurs de t lorsque $i = 100$, sont déterminées pour chaque concentration d'échantillon de référence, puis, la courbe $t_\beta = f(C)$ est tracée à partir de ces valeurs.

1.2-Résultats

La figure 2 représente la courbe $i = f(t)$, déterminée à partir des valeurs expérimentales présentées à la figure 1. La figure 4 représente la courbe de référence du vecteur rétroviral, $t_\beta = f(C)$, déterminée à partir des valeurs expérimentales présentées à la figure 3.

La figure 2 montre que l'intensité du signal est une fonction du temps t d'incubation du vecteur avec les cellules cibles et de la concentration C dudit vecteur.

La figure 2 montre également que la valeur $\beta=100$, permet une détermination sensible et précise de la concentration du vecteur car elle détecte de faibles concentrations de vecteur et pour cette valeur, les variations de C correspondent à une variation importante de t . Ces résultats sont confirmés par la figure 4 qui représente la courbe de référence du vecteur, $t_\beta = f(C)$. Cette courbe de référence montre qu'il existe une relation directe entre les valeur de t_β et de C qui permet de déterminer la concentration d'une préparation de vecteur, sans dilution et sans manipulation des cellules, simplement par détermination de la valeur expérimentale t_β de ce vecteur, correspondant à la valeur de $\beta = 100$.

EXEMPLE 2 : Comparaison du titre d'un vecteur associé à l'adénovirus recombinant (AAVr) déterminé à l'aide des paramètres d'un procédé classique (temps constant et concentration variable) ou du procédé de l'invention (temps variable et concentration constante).

2.1-Matériels et méthodes

L'agent biologique analysé est un virus associé à l'adénovirus, recombinant (AAVr), codant le gène rapporteur lacZ, les cellules cibles sont la lignée Hela-repcap32, la réaction agent biologique + cellules cible vivantes est la réplication virale et le produit P qui est mesuré pour déterminer le titre du vecteur (concentration

en particules actives ou ip) est le nombre de copies de génome de AAVr. P est mesuré par hybridation de type Dot-blot selon les techniques classiques connues de l'Homme du métier.

Les cellules Hela-repcap32 sontensemencées dans les puits d'une
5 plaque de microtitration à une concentration constante, puis co-infectées, à $t = 0$, avec les dilutions 10^{-4} , 10^{-7} , 10^{-8} et 10^{-9} du vecteur et l'adénovirus sauvage, à une multipli-
cité d'infection de 100.

Aux différents instants $t = 6$ h, 14 h, 18 h, 20 h, 24 h, 30 h, 38 h, 44
h, 48 h et 54 h, les cellules sont récoltées puis le génome viral est isolé et hybridé avec
10 une sonde nucléotidique spécifique marquée, selon la technique du Dot Blot classiquement utilisée par l'homme du métier. L'intensité du signal, qui représente la
quantité d'ADN hybridée est mesurée à l'aide d'un phosphorimageur.

Pour la détermination du titre par le procédé classique, la courbe $\log i = f(\log \text{dilution})$ est tracée à partir des valeurs obtenues au temps $t = 24$ h et le titre
15 est déterminé par approximation asymptotique dans la région des plus fortes dilutions.

Pour la détermination du titre par le procédé de l'invention, la courbe $\log i = f(t)$ est tracée pour chaque dilution de vecteur et la valeur β est fixée à -
2. Les valeurs t_β , correspondant aux valeurs de t lorsque $i = -2$, sont déterminées pour
chaque concentration de l'agent de référence, puis, la courbe $t_\beta = f(\log C)$ est tracée à
20 partir de ces valeurs.

2.2-Résultats

La figure 6 représente la courbe $\log i = f(t)$, déterminée à partir des valeurs expérimentales présentées à la figure 5. La figure 8 représente la courbe de
référence du vecteur AAVr, $t_\beta = f(\log C)$, déterminée à partir des valeurs expéri-
25 mentales présentées à la figure 7.

La figure 6 montre que l'intensité du signal est une fonction du temps t d'incubation du vecteur avec les cellules cibles et de la concentration C dudit vecteur.

La figure 6 montre également que la valeur $\beta = -2$, permet une déter-
30 mination sensible et précise de la concentration du vecteur, car elle détecte de faibles concentrations de vecteur et pour cette valeur, les variations de C correspondent à une variation importante de t .

Ces résultats sont confirmés par la figure 8 qui représente la courbe de référence du vecteur, $t_{\beta} = f(\log C)$. Cette courbe de référence montre qu'il existe une relation directe entre les valeurs de t_{β} et de C qui permet de déterminer, avec précision et sans dilution, la concentration d'une préparation de vecteur, à partir d'une
5 seule valeur expérimentale t_{β} de ce vecteur correspondant à la valeur de $\beta = -2$.

A titre comparatif, pour une même préparation de vecteur, le procédé classique donne un titre de 1×10^8 particules infectieuses/ml et le procédé de l'invention donne un titre de $0,85 \times 10^8$ particules infectieuses/ml. Ces résultats montrent que les valeurs obtenues par le procédé de l'invention sont comparables à
10 celles obtenus par les procédés classiques de titrage d'agents biologiques.

Néanmoins, contrairement aux procédés classique le procédé de détermination du titre d'agent biologiques de l'invention permet avantageusement d'analyser de nombreux échantillons, simultanément et en temps réel. En effet, il est simple, rapide, précis, standardisé, automatisable et la valeur de l'intensité du signal
15 qui mesure le produit de la réaction de l'agent biologique avec les cellules cibles vivantes est obtenue instantanément, sans intervention sur les cellules cibles et sur la réaction biologique dont le produit est mesuré.

Ainsi, le procédé de l'invention est utilisable aussi bien pour :

- cribler rapidement une banque de vecteurs de transfert de gènes
20 ou de mutants d'une protéine recombinante,
- optimiser ou contrôler la production : des vecteurs de transfert de gènes thérapeutiques utilisables pour des essais précliniques et des essais cliniques de phase I, des virus utilisés comme vaccins viraux ou des protéines recombinantes utilisées comme médicament ou comme réactif biologique et
25
- détecter rapidement une infection virale à partir d'un échantillon biologique d'un patient à tester.

Ainsi que cela ressort de ce qui précède, l'invention ne se limite nullement à ceux de ses modes de mise en œuvre, de réalisation et d'application qui viennent d'être décrits de façon plus explicite ; elle en embrasse au contraire toutes les
30 variantes qui peuvent venir à l'esprit du technicien en la matière, sans s'écarter du cadre, ni de la portée, de la présente invention.

REVENDICATIONS

1°) Procédé de détermination du titre d'un agent biologique interagissant avec des cellules cibles vivantes, caractérisé en ce qu'il comprend au moins les étapes suivantes :

- 5 (a₁) l'incubation dudit agent biologique à une concentration C initiale inconnue, avec lesdites cellules cibles à une concentration D constante,
 (b₁) la mesure à différents temps successifs t , de l'intensité i d'un même signal, qui résulte de la réaction agent biologique + cellules cibles vivantes,
 (c₁) la détermination du temps t_β correspondant à la valeur $i = \beta$,
 10 choisie dans l'intervalle $\beta_{\min} < \beta < \beta_{\max}$, tel que β_{\min} et β_{\max} correspondent aux valeurs de i au point d'inflexion de la courbe $i = f(t)$ pour respectivement les concentrations minimales et maximales d'un agent biologique de référence dont la courbe $t_\beta = f(C)$ est préétablie et
 (d₁) la détermination de la concentration C initiale de l'agent biologique, à l'aide de ladite courbe de référence $t_\beta = f(C)$.

2°) Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que simultanément ou préalablement à l'étape (a₁), ladite courbe de référence est établie selon les étapes suivantes :

- (a₀) la préparation, de n dilutions en série d'un agent biologique de
 20 référence de concentration C_0 initiale connue, correspondant respectivement aux concentrations finales C_1, C_2, \dots, C_n dudit agent biologique,
 (b₀) l'incubation de chaque dilution dudit agent biologique de référence obtenue en (a₀) avec lesdites cellules cibles à une concentration D constante,
 (c₀) la détermination à différents temps successifs t_1 à t_n de
 25 l'intensité du signal i qui résulte de la réaction agent biologique + cellules cibles vivantes, pour chaque concentration C_1, C_2, \dots, C_n dudit agent biologique de référence,
 (d₀) le tracé de la courbe $i = f(t)$ pour chaque valeur C_1, C_2, \dots, C_n ,
 (e₀) la détermination de la valeur β de i , telle que $\beta_{\min} < \beta < \beta_{\max}$ et
 30 β_{\min} et β_{\max} correspondent aux valeurs de i au point d'inflexion de la courbe $i = f(t)$ pour respectivement C_n et C_1 ,
 (f₀) le tracé de la courbe de référence $t_\beta = f(C)$ pour la valeur $i = \beta$

3°) Procédé selon la revendication 1 ou la revendication 2, caractérisé en ce que ledit agent biologique est sélectionné dans le groupe constitué par les virus, les vecteurs de transfert de gènes viraux et non-viraux, les vaccins, les anticorps et les protéines recombinantes.

5 4°) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que ledit signal est sélectionné dans le groupe constitué par la fluorescence, la luminescence, l'absorbance et le dénombrement de cellules.

5°) Trousse de dosage ou de détection d'un agent biologique, caractérisée en ce qu'elle comprend :

- 10
- des cellules cibles vivantes à une concentration D constante,
 - un agent biologique de référence de concentration C connue, et
 - la courbe de référence dudit agent biologique $t_{\beta} = f(C)$.

Figure 1

conc.	temps (h)				
	16	24	40	48	64
0.1	20,4	30,1	95,1	138,7	157,3
0.25	26,8	48,5	173,3	228,2	191,7
0.5	38,1	72	198,7	296,2	203,7

2/8

Figure 2

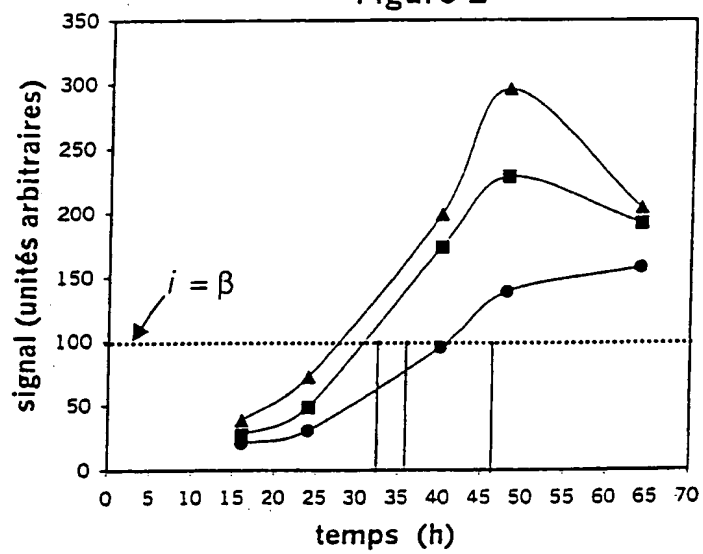
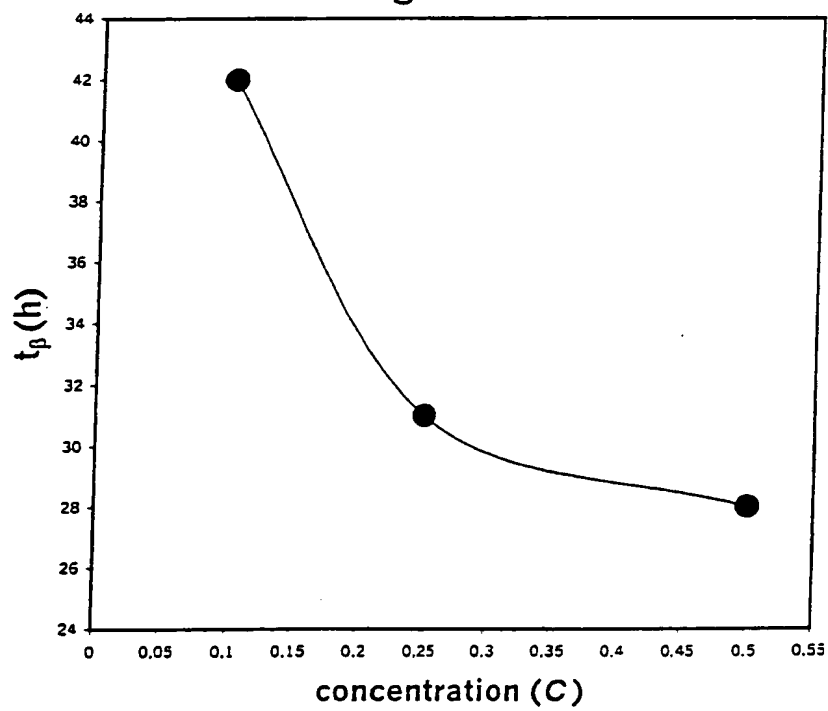


Figure 3

conc.	0,1	0,25	0,5
t _B (h)	42	31	28

4/8

Figure 4



5/8

Figure 5

conc.	temps (h)									
	6	14	18	20	24	30	38	44	48	54
10exp-4	-1,62	-1,81	-2,41	-2,61	-2,85	-3,38	-3,61	-4,01	-3,89	-3,67
10exp-7	-1,37	-1,33	-1,61	-1,73	-2,05	-2,67	-2,96	-3,23	-3,29	-3,17
10exp-8	-1,29	-1,32	-1,41	-1,36	-1,59	-1,96	-2,32	-2,58	-2,81	-2,46
10exp-9	-1,31	-1,32	-1,41	-1,38	-1,48	-1,65	-2,02	-2,22	-2,45	-2,19

6/8

Figure 6

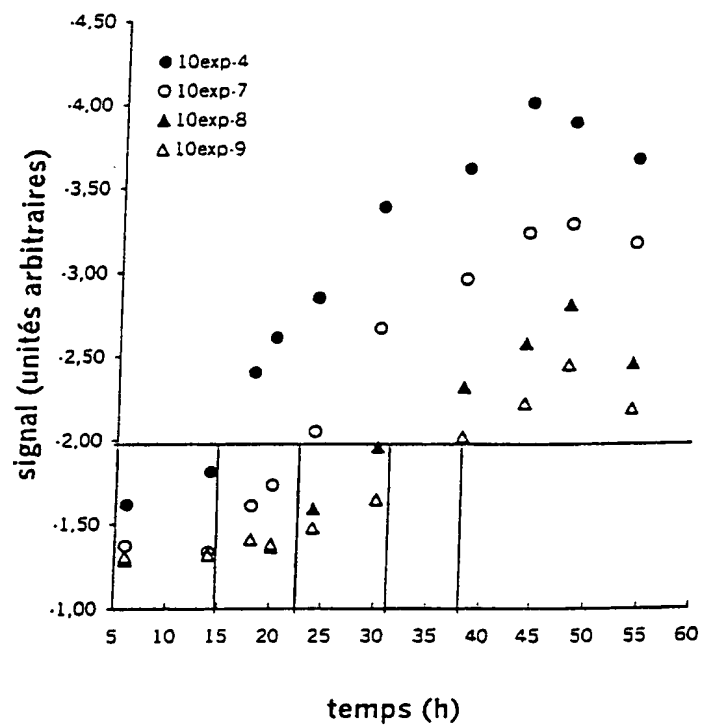
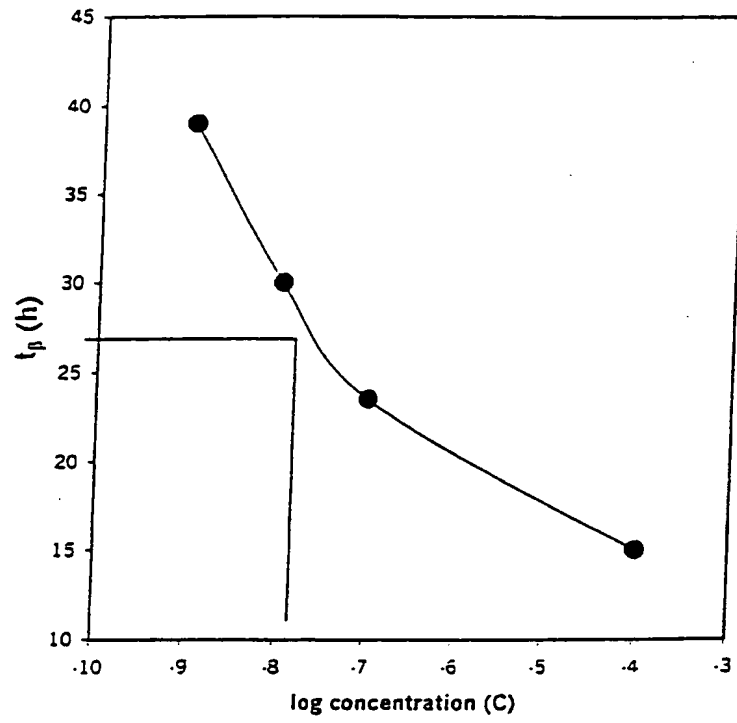


Figure 7

Conc (log)	t_p (h)
.4	15
.7	23,5
.8	30
.9	39

8/8

Figure 8



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 01/01366

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 G01N33/50 C12Q1/68 C12N7/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 G01N C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CHARBORD P; NEEL H; LEHN P; PARMENTIER C: "NORMAL HUMAN GRANULO MONOCYTIC BONE MARROW PROGENITOR CELLS RESPONSIVENESS TO COLONY STIMULATING ACTIVITY" NOUVELLE REVUE FRANCAISE D'HEMATOLOGIE, vol. 22, 1980, pages 357-370, XP000949859 page 363; figure 3	1-5
A	SCHUHMANN KLAUS; ROMANIN CHRISTOPH; BAUMGARTNER WERNER; GROSCHNER KLAUS: "Intracellular Ca ²⁺ inhibits smooth muscle L-type Ca ²⁺ channels by activation of protein phosphatase type 2B and by direct interaction with the channel" JOURNAL OF GENERAL PHYSIOLOGY, vol. 110, November 1997 (1997-11), pages 503-513, XP000949861 abstract	1-5

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *G* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

3 September 2001

Date of mailing of the international search report

12/09/2001

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Griffith, G

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 01/01366

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	MOULLIER P; DAVELOOSE D; LETERRIER F; HOEBEKE J: "COMPARATIVE BINDING OF WHEAT GERM AGGLUTININ AND ITS SUCCINYLATED FORM ON LYMPHOCYTES" EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, vol. 161, 1986, pages 197-204, XP000951462 page 199; figure 4 ---	1-5
A	DAVIS A R ET AL: "HIGH THROUGHPUT METHOD FOR CREATING AND SCREENING RECOMBINANT ADENOVIRUSES" GENE THERAPY, GB, MACMILLAN PRESS LTD., BASINGSTOKE, vol. 5, no. 8, August 1998 (1998-08), pages 1148-1152, XP000867556 ISSN: 0969-7128 the whole document ---	1-5
A	WO 99 11764 A (TARGETED GENETICS CORPORATION) 11 March 1999 (1999-03-11) cited in the application example 4 ---	1-5
A	ATKINSON E M ET AL: "A high-throughput hybridization method for titer determination of viruses and gene therapy vectors" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, GB, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, vol. 26, no. 11, 1 June 1998 (1998-06-01), pages 2821-2823, XP002099502 ISSN: 0305-1048 cited in the application the whole document ---	1-5
A	NELSON DAVID M; WAHLFORS J JARMO; CHEN LIN; ONODERA MASAFUMI; MORGAN RICHARD A: "Characterization of diverse viral vector preparations, using a simple and rapid whole-virion dot-blot method" HUMAN GENE THERAPY, vol. 9, 1 November 1998 (1998-11-01), pages 2401-2405, XP000951429 cited in the application the whole document ---	1-5
A	MITTEREDER NANETTE; MARCH KEITH L; TRAPNELL BRUCE C: "Evaluation of the concentration and bioactivity of adenovirus vectors for gene therapy" JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 70, no. 11, November 1996 (1996-11), pages 7498-7509, XP002148995 cited in the application the whole document ---	1-5

1

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 01/01366

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>SALVETTI A ET AL: "Factors influencing recombinant adeno-associated virus production" HUMAN GENE THERAPY, XX, XX, vol. 9, no. 5, 20 March 1998 (1998-03-20), pages 695-706, XP000946374 ISSN: 1043-0342 cited in the application page 697, column 2, paragraph 2 -page 699, column 1, paragraph 1 -----</p>	1-5

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Intern: ial Application No

PCT/FR 01/01366

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9911764 A	11-03-1999	AU 9306098 A EP 1009808 A	22-03-1999 21-06-2000

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dema Internationale No
PCT/FR 01/01366

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE CIB 7 G01N33/50 C12Q1/68 C12N7/02		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) CIB 7 G01N C12Q		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés) EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	CHARBORD P; NEEL H; LEHN P; PARMENTIER C: "NORMAL HUMAN GRANULO MONOCYTIC BONE MARROW PROGENITOR CELLS RESPONSIVENESS TO COLONY STIMULATING ACTIVITY" NOUVELLE REVUE FRANCAISE D'HEMATOLOGIE, vol. 22, 1980, pages 357-370, XP000949859 page 363; figure 3	1-5
A	SCHUHMANN KLAUS; ROMANIN CHRISTOPH; BAUMGARTNER WERNER; GROSCHNER KLAUS: "Intracellular Ca ²⁺ inhibits smooth muscle L-type Ca ²⁺ channels by activation of protein phosphatase type 2B and by direct interaction with the channel" JOURNAL OF GENERAL PHYSIOLOGY, vol. 110, novembre 1997 (1997-11), pages 503-513, XP000949861 abrégé	1-5
--- -/--		
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents <input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe </div>		
<div style="display: flex;"> <div style="flex: 1;"> <p>* Catégories spéciales de documents cités:</p> <p>"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date</p> <p>"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)</p> <p>"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens</p> <p>"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée</p> </div> <div style="flex: 1;"> <p>"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention</p> <p>"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément</p> <p>"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier</p> <p>"Z" document qui fait partie de la même famille de brevets</p> </div> </div>		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée <div style="text-align: center;">3 septembre 2001</div>		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale <div style="text-align: center;">12/09/2001</div>
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Fonctionnaire autorisé <div style="text-align: center;">Griffith, G</div>

Formulaire PCT/ISA/210 (deuxième feuille) (juillet 1992)

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	MOULLIER P; DAVELOOSE D; LETERRIER F; HOEBEKE J: "COMPARATIVE BINDING OF WHEAT GERM AGGLUTININ AND ITS SUCCINYLATED FORM ON LYMPHOCYTES" EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, vol. 161, 1986, pages 197-204, XP000951462 page 199; figure 4 ---	1-5
A	DAVIS A R ET AL: "HIGH THROUGHPUT METHOD FOR CREATING AND SCREENING RECOMBINANT ADENOVIRUSES" GENE THERAPY, GB, MACMILLAN PRESS LTD., BASINGSTOKE, vol. 5, no. 8, août 1998 (1998-08), pages 1148-1152, XP000867556 ISSN: 0969-7128 le document en entier ---	1-5
A	WO 99 11764 A (TARGETED GENETICS CORPORATION) 11 mars 1999 (1999-03-11) cité dans la demande exemple 4 ---	1-5
A	ATKINSON E M ET AL: "A high-throughput hybridization method for titer determination of viruses and gene therapy vectors" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, GB, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, vol. 26, no. 11, 1 juin 1998 (1998-06-01), pages 2821-2823, XP002099502 ISSN: 0305-1048 cité dans la demande le document en entier ---	1-5
A	NELSON DAVID M; WAHLFORS J JARMO; CHEN LIN; ONODERA MASAFUMI; MORGAN RICHARD A: "Characterization of diverse viral vector preparations, using a simple and rapid whole-virion dot-blot method" HUMAN GENE THERAPY, vol. 9, 1 novembre 1998 (1998-11-01), pages 2401-2405, XP000951429 cité dans la demande le document en entier ---	1-5
A	MITTEREDER NANETTE; MARCH KEITH L; TRAPNELL BRUCE C: "Evaluation of the concentration and bioactivity of adenovirus vectors for gene therapy" JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 70, no. 11, novembre 1996 (1996-11), pages 7498-7509, XP002148995 cité dans la demande le document en entier ---	1-5

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>SALVETTI A ET AL: "Factors influencing recombinant adeno-associated virus production" HUMAN GENE THERAPY, XX, XX, vol. 9, no. 5, 20 mars 1998 (1998-03-20), pages 695-706, XP000946374 ISSN: 1043-0342 cité dans la demande page 697, colonne 2, alinéa 2 -page 699, colonne 1, alinéa 1 -----</p>	1-5

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Deposition internationale No

PCT/FR 01/01366

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9911764 A	11-03-1999	AU 9306098 A EP 1009808 A	22-03-1999 21-06-2000



METHOD FOR DETERMINING THE TITER OF BIOLOGICAL AGENTS IN LIVING TARGET CELLS

The invention concerns a method for determining the titer (concentration) of biological agents, such as gene transfer viral vectors, in real time, in
5 living target cells, as well as its uses (gene therapy, functional genomics, viral diagnosis, vaccines, recombinant proteins).

The progress concerning gene transfer in the field of gene therapy depends, on the one hand on the capacity to develop and to produce vectors allowing, a regulated expression in the target cell, of a protein or an RNA which possess
10 therapeutic effects, and on the other hand on the capacity to identify new therapeutic genes.

Thus, with the recent development in the field of functional genomics, vectors initially developed for gene transfer, are also used as tools for the screening of gene libraries.

15 These progresses imply :

- the construction and the screening of gene transfer vectors libraries,
- the development of optimized vector constructs which are perfectly adapted to each therapeutic application, in particular in terms of tissue-targeting and expression regulation, and
- 20 - the production in large quantities of controlled, standardized vectors with an optimal quality, which can be used in preclinical studies and phase I clinical trials.

- In this context, in order to analyze quickly numerous vector constructs and to optimize their production in large quantities, it is important to be
25 able to determine easily, quickly and accurately the concentration of said vectors by efficient methods.

The methods for determining the concentration or the titer of said vectors, in particular of the viral vectors, described in the literature are divided into physical methods and biological methods.

30 The physical methods measure the titer of physical particles (*pp*) (Mittereder et al., J. Virol., 1996, 70, 11, 7498-7509 ; Atkinson et al., NAR, 1998, 26, 11, 2821-2823 ; Nelson et al., Hum. Gene Ther., 1998, 9, 16, 2401-2405), which

represents the total number of viral vector particles; usually this titer is estimated either directly by counting the viral particles by electronic microscopy, or indirectly by measuring the nucleic acid content of the vectors (hybridization or optical absorbance (DO₂₆₀) for AAV and AdV, respectively), or the viral proteins content of the vectors (RT activity and p24 content, for example for MLV and HIV, respectively). The physical particles titer measurement does not reflect the quantity of infectious and biologically-active particles which are present, because of the presence of non-infectious defective particles (defective-interfering particles or DI), without genome or with an incomplete genome.

The biological methods, in contrast, allow the determination of an infectious particles titer (*ip*: infectious units, plaque forming units, transduction units) (Mittereder et al., precited; Salvetti et al., Hum. Gene Ther., 1998, 9, 5, 695-706; Atkinson et al., precited) by the measurement of a biological parameter which reflects the activity of the vector in an infected cells culture : viral replication (AAV), provirus integration (retrovirus, HIV), cellular lysis [formation of plaques or foci of lysis), only in the case of lytic viruses (AdV, HSV)] and transgene expression (all types of vectors). The *ip* measures the number of active particles in the biological process from which the effect is measured. Thus, the vector preparations presenting a high titer of infectious particles and a low ratio of physical particles/infectious particles are considered as being of high quality, these two parameters being considered as providing quantitative information concerning the power of a preparation of a gene transfer vector.

Whatever the nature of the measured parameter, the methods described are essentially based on: serial dilutions of the vector preparation (about 10 to 20 dilutions in duplicate or triplicate), followed by vector with cells incubation time (1 to 15 days), then by cell treatment (lysis, fixation, coloration, substrate addition, hybridization, PCR), functional parameter measurement, and finally by titer determination; said titer is defined as the end-point dilution, which is the highest dilution at which the value of the biological parameter is below the detection threshold. The titer is generally determined from the curve which represents the values of the biological parameter according to the dilution of the vector:

- by a linear extrapolation from the quasi-linear central region of the curve, followed by determination of the intersection with the abscissa, or

- by an asymptotic estimation of said curve in the region of high dilutions; such an estimation can be made with a computer program, which is based on a hyperbolic function for the titer calculation.

Thus, the larger the number of tested dilutions, the more accurate will be the titer value.

However, these techniques have low reliability and have the disadvantage of not being standardized. To solve this problem, new methods were proposed, which are more adapted to the determination of the titer (or concentration) and the comparison of various recombinant viruses used for gene therapy (E.M. Atkinson, precited; International PCT Application WO 99/11764). For example, in the article in the name of E.M. Atkinson, precited and in the International PCT Application WO 99/11764, the method which is described comprises essentially a step of viral genetic material amplification in the host cell line, standard vector preparations of known titer obtained by serial dilutions, and an internal control of known titer. More precisely, the method includes, in several wells of a micro-titration plate, cell infection with serial dilutions of a viral preparation (10 dilutions in triplicate), replication of the viral genome in the said host cell during 48 to 72 hours, chemical lysis of said cell, hybridization of the nucleic acid, measurement of the relative quantity of viral nucleic acid replicated in each well, and the determination of the titer by linear extrapolation of the curve which represents the measured values according to the dilution of the vector.

Thus, the methods of the prior art, even the more adapted as those described by E.M. Atkinson et al., precited, do not meet practical needs for the development and the production of gene transfer vectors, for the following reasons:

- their execution is difficult and comprises numerous manipulations, at each step of the method, because of the high number of samples corresponding to each vector dilution. Consequently, they cannot be used to develop and produce gene transfer vectors, which implies the treatment of numerous samples for comparing various vector constructs or various conditions for producing the vectors, or for monitoring the vector production kinetic,

- they are not standardized for the most part,
- they are difficult to automate, because of the number and the complexity of the steps to perform, and

- the result is obtained at a fixed time which, depending on the nature of the measured parameter, varies from a few days (transgene expression) to several weeks (plaques of lysis formation). Thus, the delays required to perform these methods are not adapted to rapid determination of gene transfer vectors concentration, screening of vector libraries, control in the course of production or production kinetic monitoring of said vectors.

10 The present invention set itself the objective to supply a method for determining the titer of a biological agent which meets practical needs better than the methods of the prior art in that it allows the analysis of numerous samples in real time.

 The invention also concerns uses of said method for the screening, the analysis and the production of gene transfer viral vectors, viral vaccines and recombinant proteins, as well as for viral infection diagnosis.

15 Consequently, the present invention relates to a method for determining the titer of a biological agent interacting with living target cells, characterized in that it comprises at least the following steps:

 (a₁) the incubation of said biological agent at an unknown initial concentration C , with said target cells at a constant concentration D ,

20 (b₁) the measurement at various successive times t , of the intensity i of the same signal, which results from the reaction biological agent + living target cells,

 (c₁) the determination of the time t_b corresponding to the value $i = \beta$, chosen in the interval $\beta_{\min} < \beta < \beta_{\max}$, such that β_{\min} and β_{\max} correspond to the values of i at the inflexion point of the $i = f(t)$ curve for respectively, the minimal and maximal concentrations of a standard biological agent, for which the $t_b = f(C)$ curve (standard curve) is pre-established, and

25 (d₁) the determination of the biological agent initial concentration C , with the help of said $t_b = f(C)$ standard curve.

30 ***Preliminary Definitions:***

- biological agent means a viral or non-viral vector for gene transfer, a virus, an antibody, a vaccine or a recombinant protein.

- living target cells mean target cells, *in vitro* or *ex vivo*, before their modification by a biological agent.

- titer *C* of a biological agent means its concentration in particles (virus, gene transfer viral vector, viral vaccine) or in active molecules (recombinant proteins, antibodies), in the reaction biological agent + living target cells (*C* corresponds to the titer of infectious particles or *ip*, as defined above for gene transfer viral vectors).

- reaction biological agent + living target cells means the response of the target cells to the biologic agent or to the biological process, in particular:

- the expression of a reporter gene or of a transgene,
- the replication, the integration or the cytolytic activity of a virus,
- the enzymatic, anti-viral, oncogenic, tumor suppressor or cytotoxic activities,
- the proliferation or the cellular differentiation, or
- the binding to antibodies or to receptors.

- The product *P* of the reaction biological agent + living target cells is measurable by a signal; it is determined by the measurement of a parameter which reflects the response of the living target cells to the biological agent. Without limitation, said parameter is: the protein or enzyme quantity which is expressed by a reporter gene or a transgene, the viral vector genome copy number or the cell number.

- The signal means for example, the fluorescence, the luminescence, the absorbance or the cell numeration. The signal is measured, without limitation, by using optical or fluorescence microscopy, fluorimetry, luminometry and spectrometry.

- the measurement of the signal intensity means the measurement of the product *P* of the reaction biological agent + living target cells, without any intervention on the target cells and/or on said reaction from which product *P* is measured.

- Standard biological agent means a biological agent identical or similar to the biological agent to analyze; said standard agent presents modifications which do not affect its activity in the reaction from which product *P* is measured.

- measure in real time means a measure from which value is obtained instantaneously.

Surprisingly, the Inventor has shown that the signal intensity i , which reflects the response of the target cells to the biological agent, depends only on two parameters: the concentration C and the time t . Thus, when t increases, the signal intensity i increases, proportionally to the value of C ; as a consequence, for a constant value of C , i varies proportionally to t and for a constant value of t , i varies proportionally to C .

In contrast to the methods of the prior art which use a constant value of t for measuring the concentration C of a biological agent, the Inventor has found unexpectedly, that the use of a constant value of C allows a simpler, more rapid and more accurate determination of the biological agents concentration.

Thus, the Inventor has showed surprisingly, that the concentration of a biological sample can be determined directly, without the need to dilute said sample, by: (1) measuring the values of i at various times t and by determining the value t_B corresponding to the value $i = \beta$, and then (2) determining the value of C corresponding to the value t_B on the standard curve $t = f(C)$, such as defined above.

According to an advantageous embodiment of the method according to the invention, the standard curve is established simultaneously or before the step (a₁), as described above, according to the following steps:

(a₀) the preparation of n serial dilutions of a standard biological agent, at a known initial concentration C_0 , said dilutions corresponding to said standard biological agent final concentrations C_1, C_2, \dots, C_n , respectively,

(b₀) the incubation of each standard biological agent dilution obtained in (a₀), with said target cells at a constant concentration D ,

(c₀) the determination of the signal intensity i which results from the reaction biological agent + target living cells, for each concentration C_1, C_2, \dots, C_n of said standard biological agent, at various successive times t_1 to t_n ,

(d₀) the drawing of the $i = f(t)$ curve for each value C_1, C_2, \dots, C_n ,

(e₀) the determination of the β value of i , such that $\beta_{\min} < \beta < \beta_{\max}$ and β_{\min} and β_{\max} correspond to the values of i at the inflexion point of the $i = f(t)$ curve for C_n and C_1 , respectively, and

(f₀) the drawing of the $t_B = f(C)$ standard curve for the $i = \beta$ value.

The method according to the invention is perfectly adapted to the analysis of numerous samples in real time, because it presents the following advantages:

- 5 - it is simple,
- it is rapid,
- it is accurate,
- it is standardized and
- it is able to be automated.

Indeed, the method according to the invention does not require the
10 dilution of the samples; consequently, it is particularly adapted to the analysis of
numerous samples such as a gene transfer vectors library. For example, while, the
methods of the prior art require the preparation of 10 to 20 dilutions to determine the
titre of 30 vector samples and thus, the manipulation of 300 to 600 cell samples at
each step of the method (infection, lysis, fixation, staining, substrate addition,
15 hybridization), which implies 1800 to 2400 manipulations for a method including 3
steps (infection, lysis or fixation, and staining or substrate addition), the method
according to the invention does not require sample dilution nor cell manipulation and
simply implies 30 signal (*i*) measurements. Consequently, contrary to the methods of
the prior art, the method according to the invention is simple, perfectly standardized
20 and may be automated.

The method according to the invention is more accurate than the
methods of the prior art, since the measurements are made from the same sample
taken at various times *t*, contrary to the methods of the prior art wherein various
sample dilutions are tested separately, resulting in internal variations between various
25 dilutions.

Contrary to the techniques of the prior art which use the concentration
C as a variable parameter, the method according to the invention which uses the time
as a variable parameter, presents a number of advantages in that it allows the
determination of biological agents concentration in real time, by measuring the signal
30 *i*, by using techniques such as fluorimetry, luminometry or spectrometry.

Indeed, in the method according to the invention, the experimental
values which are available immediately allow a rapid estimation of the vector

concentration, in order to monitor the vector production kinetic or to analyze rapidly a gene transfer-vector library. The methods of the prior art, in contrast, do not allow such estimation since no intermediate results are available in the course of the experiment; the final result only is available, once all the data corresponding to the various dilutions have been obtained at the time t and then analyzed, which corresponds to a delay from several days to several weeks, depending on the technique used.

According to another advantageous embodiment of the method according to the invention, said signal is selected from the group consisting of the fluorescence, the luminescence, the absorbance and the cell numeration.

Without limitation, the signal is advantageously measured by a technique such as: optical or fluorescent microscopy, fluorimetry, luminometry and spectrometry.

According to yet another advantageous embodiment of the method according to the invention, said biological agent is selected from the group consisting of viruses, viral and non-viral vectors for gene transfer, vaccines, antibodies and recombinant proteins.

The present invention relates also to a kit for quantifying (titration) or detecting a biological agent, characterized in that it comprises:

- living target cells at a constant concentration D ,
- a standard biological agent at known concentration C , and
- the $t_B = f(C)$ standard curve of said standard biological agent.

This kit is associated with an appropriate physical mean to measure the signal intensity of the reaction biological agent + living target cells.

This kit which allows real time measurements is particularly adapted to the titer determination (titration) of a vector for use in gene therapy, a virus for use as a vaccine, a recombinant protein for use as a biological product (medicament, reagent), or to the quantification and/or to the detection of a virus, for viral infection diagnosis.

Apart from the foregoing provision, the invention also comprises other provisions which will become apparent from the following description referring to

examples of how to carry out the method forming the subject of the present invention and to the attached drawings, in which:

- figure 1 represents the experimental values of the fluorescence signal intensity i , according to the time t , for each concentration (conc.) of a retroviral vector coding for the EGFP fluorescent protein. The concentrations are expressed for 10^6 infectious particles / ml.

- figure 2 represents the $i = f(t)$ curve, determined from the experimental values presented in figure 1.

- figure 3 represents the values t_β for various vector concentrations, determined from the curve in figure 2, for the $\beta = 100$ value of i .

- figure 4 represents the $t_\beta = f(C)$ standard curve of the retroviral vector, determined from the experimental values presented in figure 3.

- figure 5 represents the experimental values of the hybridization signal intensity i , according to the time t , for each dilution of an adenovirus associated recombinant vector (rAAV).

- figure 6 represents the $i = f(t)$ curve, determined from the experimental values presented in figure 5.

- figure 7 represents the values of t_β for various concentrations of vector, determined from the curve presented in figure 6, for the value $\beta = 2$ of i .

- figure 8 represents the $t_\beta = f(C)$ standard curve of the vector rAAV, determined from the experimental values presented in figure 7.

It must be clearly understood, however, that these examples are given solely in order to illustrate the subject of the invention without in any way implying limitation.

EXAMPLE 1: Determination of the titer of a retroviral vector in Rat-2 cells.

1.1 - Materials and methods

The biological agent is a retroviral vector called pSI-EGFP (Ropp et al., Cytometry, 1995, 21, 309-317), coding for the fluorescent eukaryotic protein (*Eukaryotic Green Fluorescent Protein* or EGFP) reporter gene, the target cells are Rat-2 cells (ATC CRL1764) and the reaction biological agent + living target cells is the expression of the EGFP reporter gene. The product P which is measured for

determining the titer of said vector (concentration in retroviral infectious particles or *ip*) is the quantity of EGFP protein, which is measured by fluorimetry.

Rat-2 cells are seeded in wells of a micro-titration plate at a constant concentration, then infected at $t = 0$, with the 1/2, 1/4 and 1/10 dilutions of a standard retroviral vector preparation of known initial concentration ($C_0 = 10^6$ infectious particles / ml), said dilutions corresponding to the concentrations of 0.5×10^6 ; 0.25×10^6 and 0.1×10^6 infectious particles / ml, respectively. At times $t = 16$ hours, 24 hours, 40 hours, 48 hours and 64 hours, the fluorescence intensity signal i , emitted by cells infected with each vector dilution is measured by fluorimetry. The curve $i = f(t)$ is then drawn for each dilution and the value of β is fixed at 100. The values t_β , corresponding to the values of t when $i = 100$, are determined for each concentration of the standard samples, then, the curve $t_\beta = f(C)$ is drawn from these values.

1.2 - Results

Figure 2 represents the $i = f(t)$ curve, determined from the experimental values presented in figure 1. Figure 4 represents the $t_\beta = f(C)$ standard curve of the retroviral vector, determined from the experimental values presented in figure 3.

Figure 2 shows that the signal intensity is a function of the vector incubation time with the target cells t , and the vector concentration C .

Figure 2 shows also that the $\beta = 100$ value, allows a sensitive and accurate determination of the vector concentration since (i) it detects low concentrations of the vector, and (ii) for this value, the variations of C correspond to an important variation of t . These results are confirmed by figure 4 which represents the $t_\beta = f(C)$ standard curve of the vector. This standard curve shows that there is a direct relationship between the values of t_β and C which allows the determination of the vector preparation concentration, without dilution and without manipulation of cells, simply by determination of the t_β experimental value of this vector, corresponding to the $\beta = 100$ value.

EXAMPLE 2 : Comparison of the titer of a recombinant adeno-associated virus (rAAV) determined from the parameters of a classical method (constant time and variable concentration) or of the method according to the invention (variable time and constant concentration).

2.1 - Materials and methods

The biological agent is a recombinant adeno-associated virus (rAAV), coding for the reporter gene lacZ, the target cells are HeLa-repcap32 cell line, the reaction biological agent + living target cells is the viral replication and the product P which is measured for determining the titer of the vector (concentration in active particles or ip) is the rAAV genome copy number. P is measured by Dot-blot hybridization, according to standard techniques known by a skilled person in the art.

HeLa-repcap32 cells are seeded in wells of a micro-titration plate at constant concentration, then co-infected at $t = 0$, at a multiplicity of infection of 100, with 10^{-4} , 10^{-7} , 10^{-8} and 10^{-9} vector dilutions and the wild-type adenovirus.

Cells are harvested at various times $t = 6$ hours, 14 hours, 18 hours, 20 hours, 24 hours, 30 hours, 38 hours, 44 hours, 48 hours and 54 hours, then the viral genome is isolated and hybridized with a nucleotidic labelled probe, according to the classic Dot-Blot method, known by a skilled person in the art. The signal intensity, which represents the hybridized DNA quantity, is measured by means of a phosphoimager.

For the determination of the titer according to the classical method, the $\log i = f(\log \text{dilution})$ curve is drawn from the values obtained at the time $t = 24$ hours and the titer is determined by asymptotic estimation in the region of the highest dilutions.

For the determination of the titer according to the method of the invention, the $\log i = f(t)$ curve is drawn for each vector dilution and the β value is fixed to -2. The t_{β} values, corresponding to the values of t when $i = -2$, are determined for each concentration of the standard agent, then, the $t_{\beta} = f(\log C)$ curve is drawn from these values.

2.2 - Results

Figure 6 represents the $\log i = f(t)$ curve, determined from the experimental values presented in figure 5. Figure 8 represents the $t_{\beta} = f(\log C)$ standard curve of the vector rAAV, determined from the experimental values presented in figure 7.

Figure 6 shows that the signal intensity is a function of the vector incubation time with cells t and the vector concentration C . Figure 6 shows also that

the $\beta = -2$ value allows a sensitive and accurate determination of the vector concentration, since (i) it detects low vector concentrations, and (ii) for this value, the variations of C correspond to an important variation of t .

These results are confirmed by figure 8 which represents the $t_B = f(\log C)$ standard curve of the vector. This standard curve shows that there is a direct relationship between the t_B and C values which allows the determination of a vector preparation concentration, accurately and without dilution, from a single experimental value of t_B corresponding to the $\beta = -2$ value.

By comparison, for the same vector preparation, the classical method gives a titer of 1×10^8 infectious particles / ml and the method according to the invention gives a titer of 0.85×10^8 infectious particles / ml. These results show that the values obtained by the method according to the invention are comparable to those obtained by the classical methods for titration of biological agents.

Nevertheless, contrary to the classical methods, the method for determining the titer of biological agents according to the invention allows advantageously the analysis of numerous samples, simultaneously and in real time. Indeed, it is simple, rapid, accurate, standardized, it can be automated and the value of the signal intensity which measures the product of the reaction of the biological agent with the living target cells is obtained immediately, without intervention on the target cells and on the biological reaction from which product is measured.

So, the method according to the invention is useful for:

- the rapid screening of gene transfer vectors or recombinant protein mutants libraries,
- the production optimization or control of: therapeutic gene-transfer vectors for use in pre-clinical studies and phase I clinical trials, viruses for use as viral vaccines, or recombinant proteins for use as medicaments or biological reagents, and
- rapid detection of a viral infection from a patient biological sample.

As is apparent from the foregoing description, the invention is in no way limited to those modes of execution, embodiments and modes of application which have now been described more explicitly, on the contrary, it encompasses all

the variants thereof which may occur to those skilled in the art, without deviating from the framework or the scope of the present invention.

CLAIMS

- 1°) Method for determining the titer of a biologic agent interacting with
5 living target cells, characterized in that it comprises at least the following steps:
- (a₁) the incubation of said biological agent at unknown initial concentration C , with said target cells at constant concentration D ,
 - (b₁) the measurement at various successive times t of the intensity i of the same signal, which results from the reaction biological agent + living target cells,
 - 10 (c₁) the determination of the time t_{β} corresponding to the $i = \beta$ value, chosen in the interval $\beta_{\min} < \beta < \beta_{\max}$, such as β_{\min} and β_{\max} correspond to the values of i at the inflexion point of the $i = f(t)$ curve for respectively the minimal and maximal concentrations of a standard biological agent, for which the $t_{\beta} = f(C)$ curve is pre-established, and
 - 15 (d₁) the determination of the initial concentration C of the biologic agent, with the help of said $t_{\beta} = f(C)$ standard curve.
- 2°) Method according to claim 1, characterized in that, simultaneously or before the step (a₁), said standard curve is established according to the following steps:
- 20 (a₀) the preparation of n serial dilutions of a standard biological agent at a known initial concentration C_0 , corresponding to said biological agent final concentrations C_1, C_2, \dots, C_n , respectively,
 - (b₀) the incubation of each standard biological agent dilution obtained in (a₀), with said target cells at a constant concentration D ,
 - 25 (c₀) the determination of the signal intensity i which results from the reaction biological agent + living target cells, for each standard biological agent concentration C_1, C_2, \dots, C_n at various successive times t_1 to t_n ,
 - (d₀) the drawing of the $i = f(t)$ curve for each value of C_1, C_2, \dots, C_n ,
 - (e₀) the determination of the β value of i , such that $\beta_{\min} < \beta < \beta_{\max}$ and
30 β_{\min} and β_{\max} correspond to the values of i at the inflexion point of the $i = f(t)$ curve for C_n and C_1 , respectively, and
 - (f₀) the drawing of the $t_{\beta} = f(C)$ standard curve for the $i = \beta$ value.

3°) Method according to claim 1 or claim 2, characterized in that said biological agent is selected from the group consisting of viruses, viral and non-viral vectors for genes transfer, vaccines, antibodies and recombinant proteins.

5 4°) Method according to anyone of claims 1 to 3, characterized in that said signal is selected from the group consisting of fluorescence, luminescence, absorbance and cell numeration.

5°) Kit for the quantification or the detection of a biological agent, characterized in that it comprises:

- 10
- living target cells at a constant concentration D ,
 - a standard biological agent at known concentration C , and
 - the $t_B = f(C)$ standard curve of said standard biological agent.

ABSTRACT

Method for determining the titer (concentration) of biological agents, such as viral vectors for gene transfer, in real time, in living target cells and uses thereof in the field of gene therapy and diagnosis.

Figure 1

conc.	temps (h)				
	16	24	40	48	64
0.1	20,4	30,1	95,1	138,7	157,3
0.25	26,8	48,5	173,3	228,2	191,7
0.5	38,1	72	198,7	296,2	203,7

Figure 2

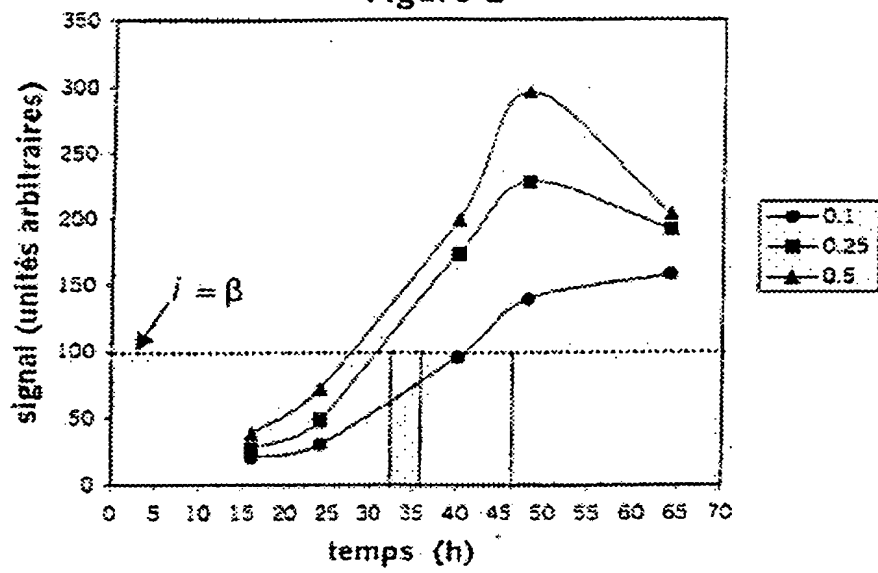


Figure 3

conc.	0,1	0,25	0,5
t_p (h)	42	31	28

Figure 4

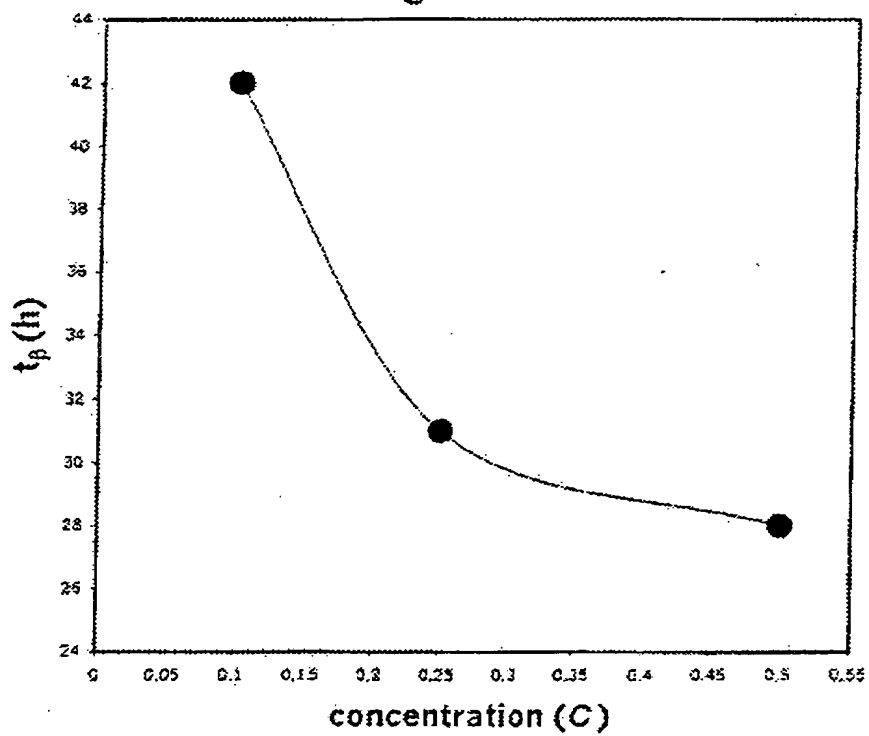


Figure 5

conc.	temps (h)									
	6	14	18	20	24	30	36	44	48	54
10exp-4	-1.62	-1.81	-2.41	-2.61	-2.85	-3.38	-3.61	-4.01	-3.89	-3.67
10exp-7	-1.37	-1.33	-1.61	-1.73	-2.05	-2.67	-2.96	-3.23	-3.29	-3.17
10exp-8	-1.29	-1.32	-1.41	-1.36	-1.59	-1.96	-2.32	-2.58	-2.81	-2.46
10exp-9	-1.31	-1.32	-1.41	-1.38	-1.48	-1.65	-2.02	-2.22	-2.45	-2.19

Figure 6

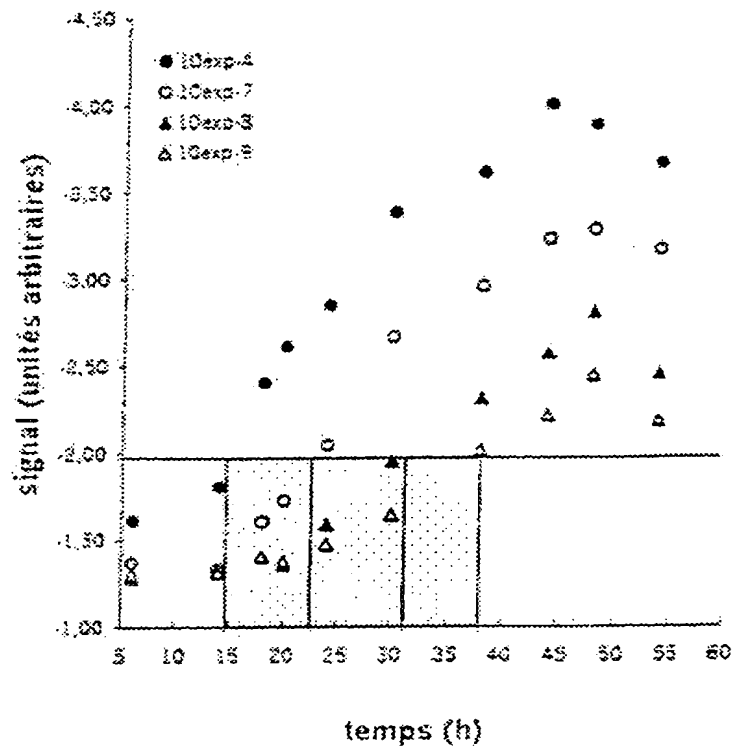


Figure 7

Conc (log)	t_g (h)
.4	15
.7	23.5
.8	30
.9	39

Figure 8

